

---

## 学 位 論 文

---

### 骨芽細胞様細胞における持続的圧縮力による heat shock protein 25の発現誘導

長尾 大輔

キーワード：持続的圧縮力，骨芽細胞様細胞，COX-2，Hsp25，インテグリン

### The Induction of Heat Shock Protein 25 in a Mouse Osteoblast-like Cell Line in Response to Compressing Force

Daisuke NAGAO

**Abstract :** It is well known that appropriate occlusal force promotes bone formation around implants, whereas bone atrophy and bone resorption develop under no mechanical stress or overstrengthening. It has been reported that shear stress loaded to osteoblasts induce increase of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, activation of protein kinase A, and upregulation of cyclooxygenase 2 (COX-2) gene, which lead to differentiation of osteoblasts. The purpose of this study was to clarify appropriate levels of stress for the bone remodeling and mechanotransduction signaling at molecular levels.

We examined mRNA levels of genes associated with bone formation when compressing force was directly loaded to a mouse osteoblast-like cell line (MC3T3-E1) for 24 hours. Furthermore, we examined changes of gene expression under its stress by DNA microarray.

COX-2, c-fos, and alkaline phosphatase (ALP) mRNAs were up-regulated in proportion to the stress value when compressing force was loaded. The analysis of cDNA macroarray showed that expression of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and BMP7, which promote differentiation of osteoblasts, was up-regulated. And the analysis of DNA microarray showed that compressing force up-regulated expression of heat shock protein 25kDa (Hsp25). Induction of Hsp25 by compressing force to MC3T3-E1 cells was mediated mainly via integrin and ERK (Extracellular signal-regulated kinase) signaling pathways. Furthermore, it was revealed that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx from stretch activated calcium ion channel and L-type voltage - sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channel by compressing force was involved in induction of Hsp25 and COX-2. Because Hsp25 suppressed the activation of caspase 3, Hsp25 induced by compressing force seemed to act on anti - apoptosis.

In conclusion, compressed force to MC3T3-E1 cells induced COX-2 and Hsp25, which lead to differentiation and suppression of apoptosis in osteoblasts.

## 緒 言

生体内では、さまざまな組織や細胞が力学的負荷（メカニカルストレス）に曝されている。細胞が力学的負荷に対して、どのように応答するかは多くのことが未知である。骨は、宇宙における無重力状態や長期寝たきり状態などのメカニカルストレスの減少した状態では、骨形成が減少して骨量、骨強度の低下がもたらされる一方、運動など適度なメカニカルストレスが加わった状態では骨形成が促進され骨量、骨強度が増大する。しかし、過度のメカニカルストレスに対しては骨破壊を起こす。このように骨には、生理的なメカニカルストレスの幅を感じるメカノセンサーが存在すると考えられている<sup>1,2)</sup>。機能圧を直接周囲骨で支持する歯科インプラントにおいても、適切な咬合力の負荷はインプラント周囲骨の形成を促進させる<sup>3)</sup>。逆に咬合力が過度に大きいと、周囲骨が吸収され、インプラント体と骨とのオッセオインテグレーションの喪失につながる。このように機能圧の適正な付与は、インプラント周囲骨の早期形成とその維持において重要である。

近年では動物を用いた *in vivo* の実験<sup>4,5)</sup> のみならず、培養細胞を用いてメカニカルストレスが細胞に受容される分子機構を解明しようとする研究が多く行われるようになってきている。細胞にメカニカルストレスを加える方法としては、培養液に液流を与えて細胞に刺激を加える fluid shear stress<sup>6,8)</sup> や、培養基質を伸展、収縮させるような伸縮力<sup>9,10)</sup> などがあげられる。骨細胞では、メカニカルストレスを加えることにより細胞がメカニカルストレスを感知し、stretch activated calcium ion channel（以下 SA チャンネルと略す）や L type voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル（以下 L-VSCC と略す）を通じて細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内に流入し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する。そして cAMP が増加し、protein kinase A（以下 PKA と略す）が活性化され、プロスタグランジン合成酵素である cyclooxygenase-2（以下 COX-2 と略す）や、転写因子である c-fos、さらには骨芽細胞の分化に関係するオステオポンチンやオステオカルシン、bone sialoprotein などの遺伝子発現が上昇し、その結果骨芽細胞の増殖、分化が促進されることが報告されているが<sup>6, 11-13)</sup>、まだそのメカニズムは不明な点が多い。また、細胞がどのようにメカニカルストレスを感知するのかは明らかにされていない。

骨芽細胞に直接的な圧縮力を加える実験はほとんど行われておらず、骨芽細胞様細胞に対して骨形成促進に作用するにはどの程度の直接的な圧縮力が必要であるかは不明である。本研究では、マウス骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）に対して圧縮力を加えた際に、どのような遺伝子の発現変化が認められるか、また発現誘導された遺伝子がどのような機能を果たすかを検討した。

## 材料と方法

### 1) 細胞と細胞培養

マウス骨芽細胞様細胞株（MC3T3-E1）と、マウス筋芽細胞株（C2C12）、およびマウス線維芽細胞株（NIH3T3）を使用した。MC3T3-E1 細胞と C2C12 細胞は、10 % fetal bovine serum（以下 FBS と略す, Japan Bioserum）、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン、0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンホテリシン B（Sigma, St. Louis, MO, USA）、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アスコルビン酸（Sigma）を添加したアルファ変法イーグル培地（以下  $\alpha$ -MEM と略す, Sigma）にて、37℃、5 %  $\text{CO}_2$  条件下で培養を行った。NIH3T3 細胞は、5 % FBS、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン、0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンホテリシン B（Sigma）を添加した  $\alpha$ -MEM にて、37℃、5 %  $\text{CO}_2$  条件下で培養を行った。

### 2) 細胞の加圧方法

それぞれの細胞を、直径35 mm の6-well dish に70 % コンフルエントになるよう培養を行った。そしてメディアウムを交換後、鉛の分銅で重さを調節した直径20 mm のガラスシリンダーにて、圧縮力を加えた。圧縮力の値は、ガラスシリンダーと鉛の分銅の重さから浮力を除いた値とし、細胞に圧縮力を 0 Pa、98 Pa、294 Pa、490 Pa の大きさで一定時間加えた（図1）。

### 3) RNA 抽出と reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

細胞に24時間圧縮力を加えた後、ガラスシリンダーを取り除き、Total RNA Isolation Mini Ki（Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA）により圧縮力を加えた細胞からのみ total RNA を抽出した。Complementary DNA（以下 cDNA と略す）の合成は、iScript™ cDNA Synthesis Kit（Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA）により行った。すなわち 1  $\mu\text{g}$  の total RNA を用い、5  $\times$  iScript Reaction Mix、iScript Reverse Transcriptase を加え、25℃、5 分間、42℃で30分間逆転写反応をさせた後、85℃、5 分間加熱して反応を停止し、cDNA を得た。得られた cDNA を含む溶液 1  $\mu\text{l}$  と、10 $\times$  PCR Buffer（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ （Applied Biosystems）、0.2 mM dNTP mixture（Applied Biosystems）、1 U AmpliTaq Gold® DNA Polymerase（Applied Biosystems）および表1に示す各特異的プライマーを用い、サーマルサイクラーにて至適条件下で PCR 反応を行った。反応生成物は、8 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、AE-6911FXFD 型プリントグラフ（アトー株式会社、東京）にて検出および撮影を行った。デンシトメトリック分析は、NIH Image 1.62 プログラムを用いて行い、COX-2、c-fos、および alkaline phosphatase（以下 ALP と略す）mRNA の発現レベルを TATA box binding protein（以下 TBP と

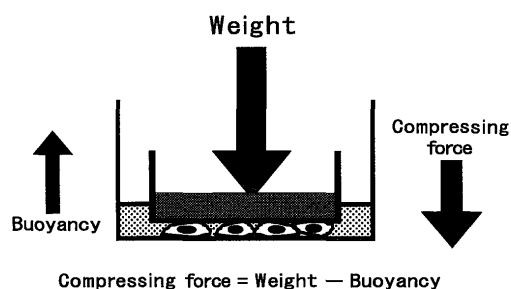


図 1. 細胞への圧縮力の加え方

表 1. RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列

遺伝子		塩基配列	アニーリング 温度 (°C)	増幅産物のサイズ (bp)
COX-2	sense	5'-GGGTTGCTGGGGGAAGAAATGTG-3'	60	113
	antisense	5'-GAAGCGTTTCGGTACTCAT-3'		
c-fos	sense	5'-CGCAGAGCATCGGAGAAGG-3'	60	360
	antisense	5'-TGAGAAGGGCAGGGTGAAGG-3'		
ALP	sense	5'-TACCGACCTGTTCTGAGGG-3'	55	313
	antisense	5'-ACCCTGGGTAGACAGCCAA-3'		
TBP	sense	5'-ACCCTTCACCAATGACTCCTATG-3'	60	190
	antisense	5'-ATGATGACTGCAGCAATCG-3'		

略す) mRNA の発現レベルで標準化した。

#### 4) 細胞増殖能の検討

直径20 mmのカバーガラス上に70%コンフルエントになるまでMC3T3-E1細胞を培養し、その後ガラスシリンダーにて圧縮力 294 Pa を加えた。24時間後に、ガラスシリンダーを取り除き、培地を交換し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, 熊本) の溶液を 100 µl/ml の終濃度になるよう添加した。4時間インキュベーション後の培地の吸光度を DU® 530 life science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) にて450 nm の波長で測定を行った。

#### 5) cDNA マクロアレイ解析

3) と同様の手法にて total RNA を抽出し、骨形成関連遺伝子96遺伝子が搭載されている Gearray™ Q and S Series KIT (SuperArray Bioscience Corp, Frederick, MD, USA) により発現量に変化を認める遺伝子を検討した。すなわち, total RNA 5 µg と RT-Labeling Kit (SuperArray Bioscience Corp), RNase inhibitor (Promega Corp, Madison, WI, USA), MMLV reverse transcriptase (Promega), biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いてプロトコルに従い cDNA プローブを作製した。その後96遺伝子が搭載されているメンブレンと cDNA プローブをハイブリダイズさせ、メンブレンを wash solution 1 (2 × SSC, 0.5% SDS) にて60°C, 15分間で2回洗浄後、さらに wash solution 2 (0.1 × SSC, 0.5% SDS) にて60°C, 15分間で2回洗浄した。そしてメンブレンをブロッキング後、アルカリフォスファターゼ標識したストレプトアビジンと結合させ、CDP-Star 試薬と X 線フィルムを用いてシグナルを可視化し、cyclophilin A mRNA にて発現レベルを標準化した。

#### 6) マイクロアレイ解析

3) と同様の手法にて total RNA を抽出し、AceGene Mouse Oligo Chip 30K (日立ソフト, 東京) を用いて圧縮力を加えた細胞と加えていない細胞における遺伝子発

現量の差を網羅的に調べた。なお、ハイブリダイゼーションおよび解析は、バイオマトリックス研究所 (東京) に委託した。

#### 7) Real-time Quantitative RT-PCR

MC3T3-E1 細胞を70%コンフルエントになるまで培養を行い、MEK1/2 阻害剤: PD98059 (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA), p38 阻害剤: SB203580 (Calbiochem), JNK 阻害剤: JNK inhibitor I (Calbiochem), PKA 阻害剤: PKI 6-22Amide (Calbiochem), AKT/PKB (protein kinase B) 阻害剤: LY294002 (Calbiochem), インテグリン阻害剤: GRGDS peptide (Calbiochem) をそれぞれ dimethyl sulfoxide (以下 DMSO と略す, 和光純薬, 大阪) に溶解して培地に添加した。また SA チャンネルのブロッカーである gadolinium chloride (以下 GdCl<sub>3</sub> と略す, Sigma) は滅菌蒸留水に溶解し、L-VSCC のブロッカーである nifedipine (Calbiochem) はエタノール (和光純薬) に溶解し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> をキレートする BAPTA/AM (Calbiochem) は DMSO に溶解し、それぞれ培地に添加した。1時間インキュベーション後、圧縮力294 Pa を24時間加え、上記3) と同様にして cDNA を合成した。得られた cDNA 1 µl を用いて、SYBR®Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) と、表 2 に示す heat shock protein (以下 Hsp と略す) 25, COX-2, TBP の特異的プライマーを加え、Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で反応させた。TBP を内部標準として、それぞれの mRNA の定量を行った。

#### 8) ウェスタンブロット法

MC3T3-E1 細胞に圧縮力294 Pa を一定時間加えた後、溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 8.0/150 mM NaCl/ 1 % Triton X-100/ 1 mM EDTA) にて細胞を溶解した。その後氷上で30分インキュベーション後、4°C, 15,000 rpm で遠心し上清を試料とした。総蛋白質量10 µg にサンプルバッファーを混和し過熱後、12% ポリアクリルアミドゲルを用いてドデシル硫酸ナトリウム-

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、分離した蛋白を PVDF 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) にトランスファーした。PVDF 膜は Blocking One (ナカライテクス, 京都) でブロッキングした後、1 次抗体として Tween-20 (Sigma) を含むトリス緩衝液 (以下 TBS-T と略す) で 1,000 倍希釈した抗マウス Hsp25 ラビットポリクロナル抗体 (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada), 抗マウス  $\beta$ -actin マウスモノクロナル抗体 (Sigma), 抗ラット p44/42 MAP Kinase ラビットポリクロナル抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 抗ヒト Phospho-p44/42 MAP Kinase ラビットモノクロナル抗体 (Cell Signaling Technology), 抗ヒト p38 MAP Kinase ラビットポリクロナル抗体 (Cell Signaling Technology), 抗ヒト Phospho-p38 MAP Kinase ラビットモノクロナル抗体 (Cell Signaling Technology), 抗ヒト SAPK/JNK ラビットモノクロナル抗体 (Cell Signaling Technology), 抗ヒト Phospho-SAPK/JNK ラビットモノクロナル抗体 (Cell Signaling Technology), 抗ヒト Cleaved Caspase 3 ラビットポリクロナル抗体 (Cell Signaling Technology), 抗ヒト FAK ラビットポリクロナル抗体 (BioSource International Inc., USA), 抗ヒト Phospho-FAK [pY397] ラビットポリクロナル抗体 (BioSource) にて室温、1 時間反応させた。メンブレンを TBS-T で十分に洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識された抗ラビット IgG 抗体 (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ, USA), または抗マウス IgG 抗体 (Amersham Biosciences) を室温で 1 時間反応させた。さらに TBS-T で洗浄後、ECL-plus 試薬 (Amersham Biosciences) を用いて検出した。

## 9) 統計学的検索

mRNA 発現量, 細胞増殖能におけるデータは Student's t-test を用いて統計学的処理を実施し,  $p < 0.05$  以下を統計学的に有意とした。

## 結 果

### 1) 適正な圧縮力の検討と圧縮力による COX-2, c-fos, ALP の mRNA 発現量の変化

この系における適正な圧縮力を検討するために、圧縮力 98 Pa, 294 Pa, 490 Pa を 24 時間加え、COX-2, c-fos, および ALP 遺伝子の発現量を、RT-PCR 法にて検討した。MC3T3-E1 細胞では、圧縮力を加えると 98 Pa, 294 Pa と圧縮力の大きさに依存して COX-2, c-fos mRNA の発現量が共に増加した (図 2 A)。また、骨芽細胞の分化マーカーである ALP mRNA の発現量も増加した (図 2 A)。しかし 490 Pa では、細胞の形態が変化するとともに細胞数が減少しており、得られた RNA 量は 294 Pa の 1/50 程度まで減少していた。従って、これらの結果から、この系では 294 Pa の圧縮力を用いるのが最も有効であると考え、以下の実験では 294 Pa の圧縮力を用

いることとした。次に、COX-2, c-fos, ALP mRNA の発現量の増加が MC3T3-E1 細胞に特異的かどうか検討するため、MC3T3-E1 と同じ間葉系の細胞である C2C12 細胞と NIH3T3 細胞を用いて同様の実験を行った。C2C12 細胞, NIH3T3 細胞の両細胞ともに、COX-2, c-fos mRNA の発現量は増加したが、ALP mRNA の発現は確認できなかった (図 2 B, C)。

### 2) 圧縮力の細胞増殖能への影響

MC3T3-E1 細胞において、圧縮力が細胞増殖に与える影響を検討した。細胞に圧縮力を加えないもの (以下コントロール群) と細胞に圧縮力 294 Pa を加えたもの (以下加圧群) との間に、Cell Counting Kit-8 処理時の吸光度の差は認められなかった (図 3)。このことから、294 Pa の圧縮力は細胞の増殖能には影響しないことが示唆された。

### 3) 圧縮力で発現量の変化する遺伝子の検討

MC3T3-E1 細胞において、圧縮力により発現量に変化する遺伝子を網羅的に検討するために、cDNA マクロアレイ法とマイクロアレイ法を用いてコントロール群と加圧群 (294 Pa) との間で発現量が変動する遺伝子の解析を行った (表 2)。cDNA マクロアレイ法では、圧縮力により BMP 4 (bone morphogenetic protein 4) および BMP 7 の発現量が増加していた (図 4)。また、マイクロアレイ法では、48 遺伝子の発現量が圧縮力により 2 倍以上増加した (表 3)。マイクロアレイ法の結果を Real-Time Quantitative RT-PCR 法にて定量的に確認したところ、Hsp25 mRNA の発現量が約 8 倍の増加を示すことが認められた (図 5 A)。

### 4) 圧縮力により発現誘導された Hsp25, COX-2 のシグナル伝達経路の検討

圧縮力による Hsp25, COX-2 発現誘導がどのようなシグナル伝達系を介するのかを各種阻害剤を用いて検討した。MAP Kinase シグナル伝達系である MEK1/2 阻害剤: PD98059 (最終濃度 10  $\mu$ M), p38 阻害剤: SB20358 (最終濃度 30  $\mu$ M), SAPK/JNK 阻害剤: JNK inhibitor I (最終濃度 10  $\mu$ M) を培地中に添加し 1 時間インキュベーションした後、圧縮力 (294 Pa) を 24 時間加えた。圧縮力によって発現誘導された Hsp25 mRNA の発現量は、PD98059 を培地中に添加したときに抑制されたが、他の MAP Kinase 阻害剤 (SB20358, JNK Inhibitor I) を添加しても、Hsp25 mRNA の発現増加は抑制されなかった (図 5 A)。また、上記の阻害剤を添加したときの Hsp25 蛋白の増加量について検討した。圧縮力により Hsp25 蛋白量が増加したが、PD98059 を添加すると Hsp25 蛋白量の増加が抑制された (図 5 B)。一方 COX-2 mRNA 発現誘導は、MAP Kinase の阻害剤では発現が抑制されなかったが、PKA の阻害剤である PKI 6-22 Amide (1  $\mu$ M)

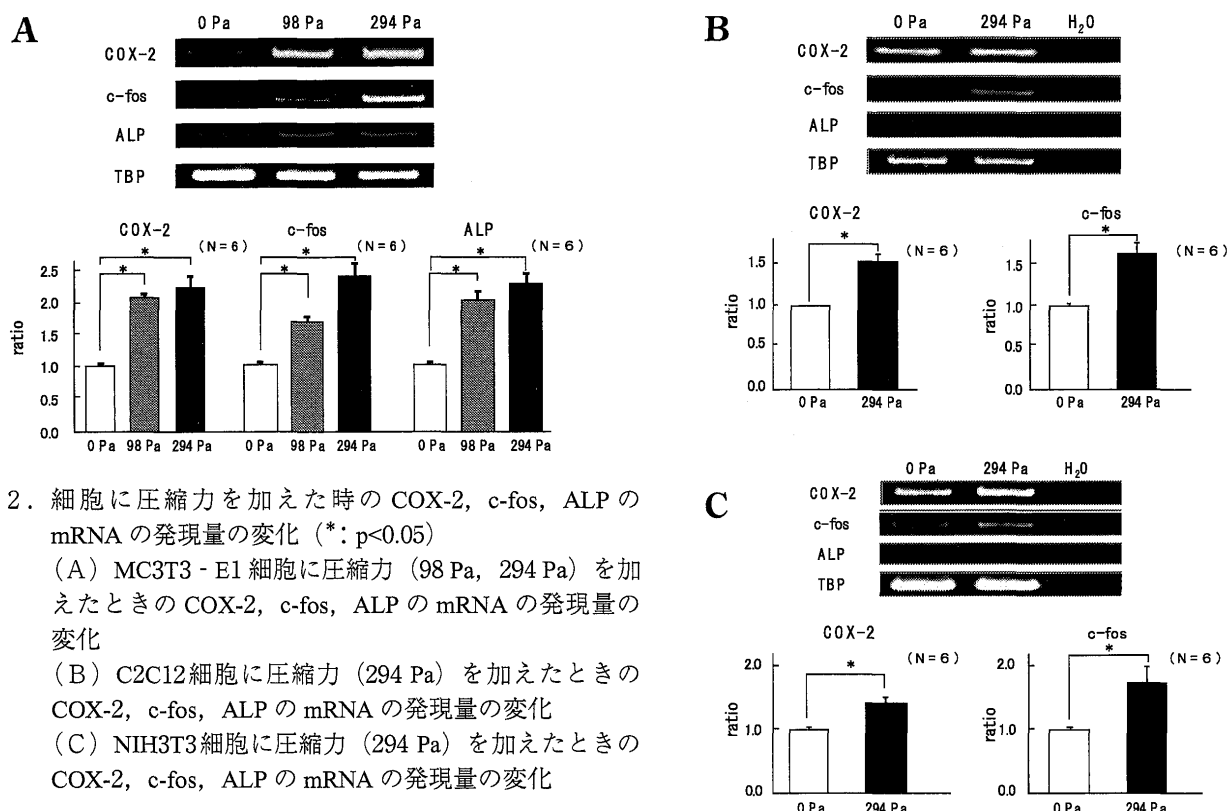


図2. 細胞に圧縮力を加えた時の COX-2, c-fos, ALP の mRNA の発現量の変化 (\*:  $p < 0.05$ )

(A) MC3T3-E1 細胞に圧縮力 (98 Pa, 294 Pa) を加えたときの COX-2, c-fos, ALP の mRNA の発現量の変化

(B) C2C12 細胞に圧縮力 (294 Pa) を加えたときの COX-2, c-fos, ALP の mRNA の発現量の変化

(C) NIH3T3 細胞に圧縮力 (294 Pa) を加えたときの COX-2, c-fos, ALP の mRNA の発現量の変化

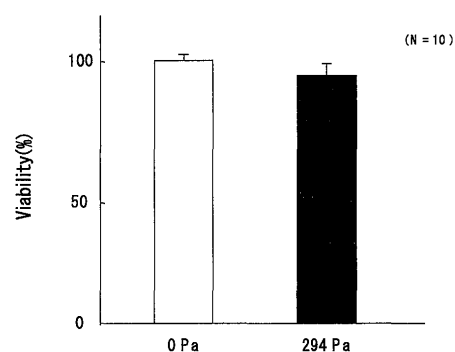


図3. 圧縮力を加えた際の細胞増殖能

MC3T3-E1 細胞に圧縮力を加えていない細胞 (無加圧: 0 Pa) と圧縮力を加えた細胞 (加圧: 294 Pa) の細胞増殖能を Cell Counting-Kit 8 にて検討した。

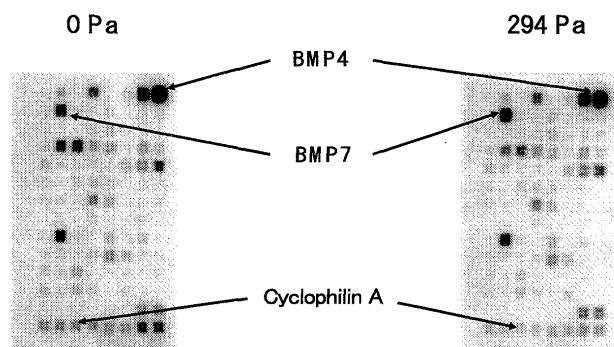


図4. cDNA マクロアレイの結果

MC3T3-E1 細胞に圧縮力を加えていない細胞 (無加圧: 0 Pa) と圧縮力を加えた細胞 (加圧: 294 Pa) における骨形成関連遺伝子の発現量の差。BMP4 と BMP7 の発現量が圧縮力により増大した。

表2. Real-Time Quantitative RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列

遺伝子		塩基配列	アニーリング温度 (°C)	増幅産物のサイズ (bp)
Hsp25	sense	5'-TCAACCACTTCGCTCCGGAG-3'	60	126
	antisense	5'-TGTATTTCGGGTGAAGCAC-3'		
COX-2	sense	5'-GGGTTGCTGGGGGAAGAAATGTG-3'	60	113
	antisense	5'-GAAGCGTTCCGGTACTCAT-3'		
TBP	sense	5'-ACCCCTCACCAATGACTCCTATG-3'	60	190
	antisense	5'-ATGATGACTGCAGCAAATCG-3'		

表3. マイクロアレイによる解析

Gene name	Ratio	Gene name	Ratio
heat shock protein 25kda	8.948	aldolase 1, A isoform	2.782
disabled homolog 1 ( Drosophila )	8.305	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1	2.754
ERO1-like ( S.cerevisiae )	8.138	phosphoglycerate kinase 1	2.739
heat shock protein 25kda	5.023	lactate dehydrogenase 1 A chain	2.721
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4.445	RIKEN cDNA 4930480E11 gene	2.671
adipose differentiation related protein	4.268	heat shock protein 86kda	2.609
stromal cell derived factor receptor 1	3.912	RIKEN cDNA 4731417B20 gene	2.594
olfactory receptor 1	3.781	metallothionein 1	2.559
chemokine -like receptor 1	3.717	glucose phosphate isomerase 1	2.555
heme oxygenase 1	3.662	solute carrier family 2	2.549
polymeric immunoglobulin receptor	3.438	RIKEN cDNA 2310056P07 gene	2.543
immediate early response 3	3.429	fibroblast growth factor inducible 15	2.514
N-myc downstream regulated-like	3.379	RIKEN cDNA 9130013K24 gene	2.490
glucose phosphate isomerase 1	3.252	triosephosphate isomerase	2.477
RIKEN cDNA 4933425L11 gene	3.122	histocompatibility 2, class II antigen A,beta 1	2.423
RIKEN cDNA 2410012A13 gene	3.096	basigin	2.369
aldolase 1, A isoform	3.089	transformed mouse 3T3 cell double minute 2	2.321
RIKEN cDNA 2610102M01 gene	3.009	RIKEN cDNA 4931431C02 gene	2.308
solute carrier family 2	2.976	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	2.268
angiotensin converting enzyme	2.919	vomeronal 2, receptor, 6	2.255
neuropeptide Y receptor Y1	2.878	CCAAT/enhancer binding protein ( C/EBP ), beta	2.251
translocation associated membrane protein 1	2.864	heat shock protein 25kda	2.244
RIKEN cDNA 1700065O13 gene	2.808	HLA-B associated transcript 4	2.207

Ratio: 圧縮時 / 非圧縮時

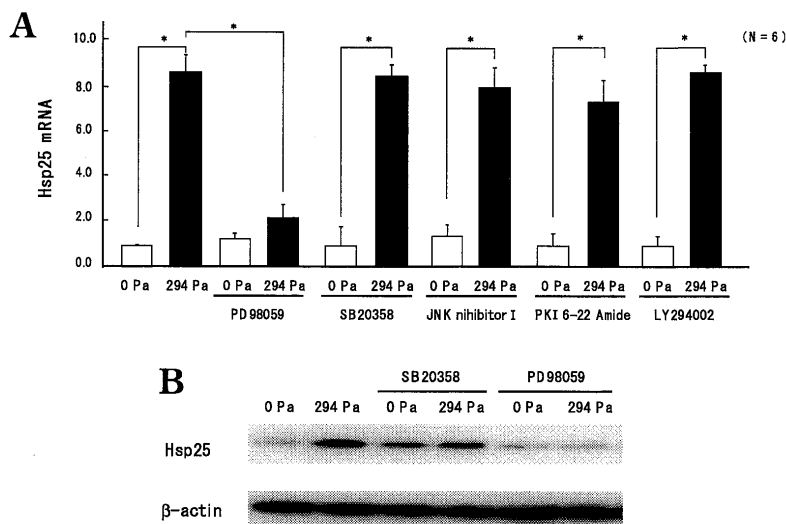


図5. Hsp25の発現誘導に対する各種阻害剤の影響

培地中に PD98059 (最終濃度10  $\mu$ M), SB20358 (最終濃度30  $\mu$ M), JNK inhibitor I (最終濃度10  $\mu$ M), PKI 6-22 Amide (最終濃度1  $\mu$ M), LY294002 (最終濃度30  $\mu$ M) を添加し, MC3T3-E1 細胞に圧縮力 (294 Pa) を加えた。

(A) Hsp25 mRNA 発現量 (\*:  $p < 0.05$ )

(B) Hsp25 蛋白の増大量

により誘導が阻害された (図6)。

##### 5) 圧縮力による MAP Kinase のリン酸化の変化

MC3T3-E1 細胞に圧縮力を加えた時の MAP Kinase のリン酸化の変化を検討した。p44/42 MAP Kinase (ERK1/2), および p38 MAP Kinase は, 圧縮力を加えて15分後にリン酸化が増大し, 6時間後まで持続した。しかし, JNK のリン酸化の増大はみられなかった (図7A)。さらに, PD98059 あるいは SB20358 を培地中に添加すると, p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) あるいは p38 MAP Kinase のリン酸化は抑制された (図7B)。

##### 6) 圧縮力による Hsp25 の発現誘導におけるインテグリンの関与

MC3T3-E1 細胞において圧縮力による Hsp25 の発現誘導に対するインテグリンの関与を検討するため, インテグリン阻害剤 GRGDS peptide (50  $\mu$ g/ml) を培地中に添加して Hsp25 mRNA の発現量を Real-time Quantitative RT-PCR 法にて, また Hsp25 蛋白の増加および focal adhesion kinase (以下 FAK と略す) のリン酸化の増大の有無をウェスタンブロット法にて調べた。圧縮力による Hsp25 mRNA の発現誘導は GRGDS peptide を添加することによって抑制され, Hsp25 蛋白の増加量も減少した (図8A, B)。さらに, FAK のリン酸化の増大も抑制

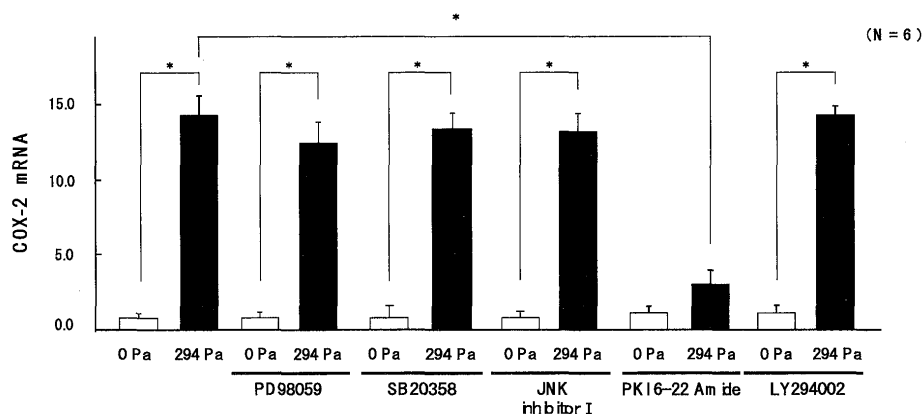


図6. 各種阻害剤による COX-2 mRNA の発現量の変化

培地中に PD98059 (最終濃度10  $\mu$ M), SB20358 (最終濃度30  $\mu$ M), JNK inhibitor I (最終濃度10  $\mu$ M), PKI 6-22 Amide (最終濃度1  $\mu$ M), LY294002 (最終濃度30  $\mu$ M) を添加し, MC3T3-E1細胞に圧縮力 (294 Pa) を加えた。(\*:  $p < 0.05$ )

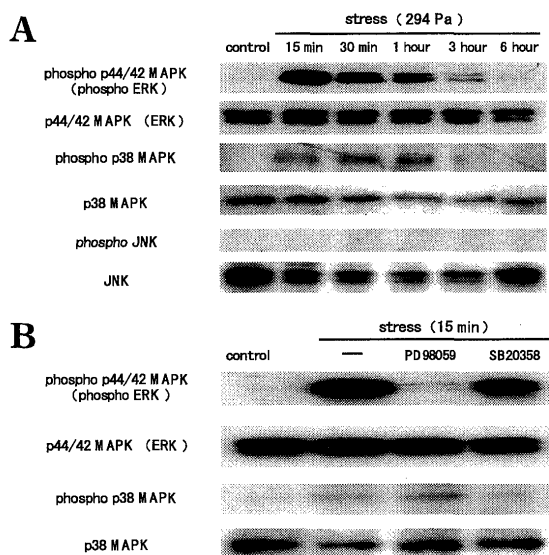


図7. 圧縮力を加えた際の MAP Kinase の活性化

(A) MC3T3-E1細胞に圧縮力 (294 Pa) を加えた時の MAP Kinase (ERK, p38, JNK) のリン酸化状態  
(B) 培地中に PD9805 (最終濃度10  $\mu$ M), SB20358 (最終濃度30  $\mu$ M), を添加し, MC3T3-E1細胞に圧縮力 (294 Pa) を加えた時の ERK, p38 のリン酸化状態

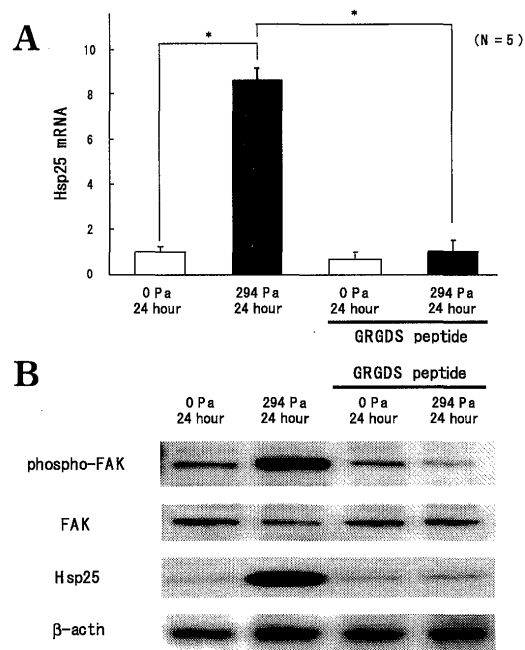


図8. RGDS peptide (最終濃度50  $\mu$ g/ml) を添加した時の Hsp25 mRNA, 蛋白の増大量  
(A) Hsp25 mRNA の発現量 (\*:  $p < 0.05$ )  
(B) Hsp25 および FAK 蛋白のリン酸化の増大

された (図8B)。

## 7) 細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 流入による Hsp25, COX-2 の発現誘導への関与

圧縮力による Hsp25 の発現誘導におけるカルシウム流入の関与を検討するため, SA チャンネルのブロッカーである  $\text{GdCl}_3$  (10  $\mu$ M), L-VSCC のブロッカーである nifedipine (10  $\mu$ M), 細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートする BAPTA/AM (50  $\mu$ M) を培地中に添加後, 圧縮力を加え Hsp25 の mRNA の発現量を検討した。  $\text{GdCl}_3$ ,

nifedipine あるいは BAPTA/AM 処理により圧縮力による Hsp25 の発現量は減少傾向を示した。一方 COX-2 の発現誘導は BAPTA/AM あるいは  $\text{GdCl}_3$  処理により約 1/2 に抑制された (図9A, B)。

## 8) Hsp25 の caspase 3 活性化への影響

圧縮力により誘導された Hsp25 がアポトーシスに関与するかどうか検討した。GRGDS peptide を添加し, Hsp25 の圧縮力による発現誘導を抑制した際の活性化 caspase 3 量をウェスタンブロットにて解析した。

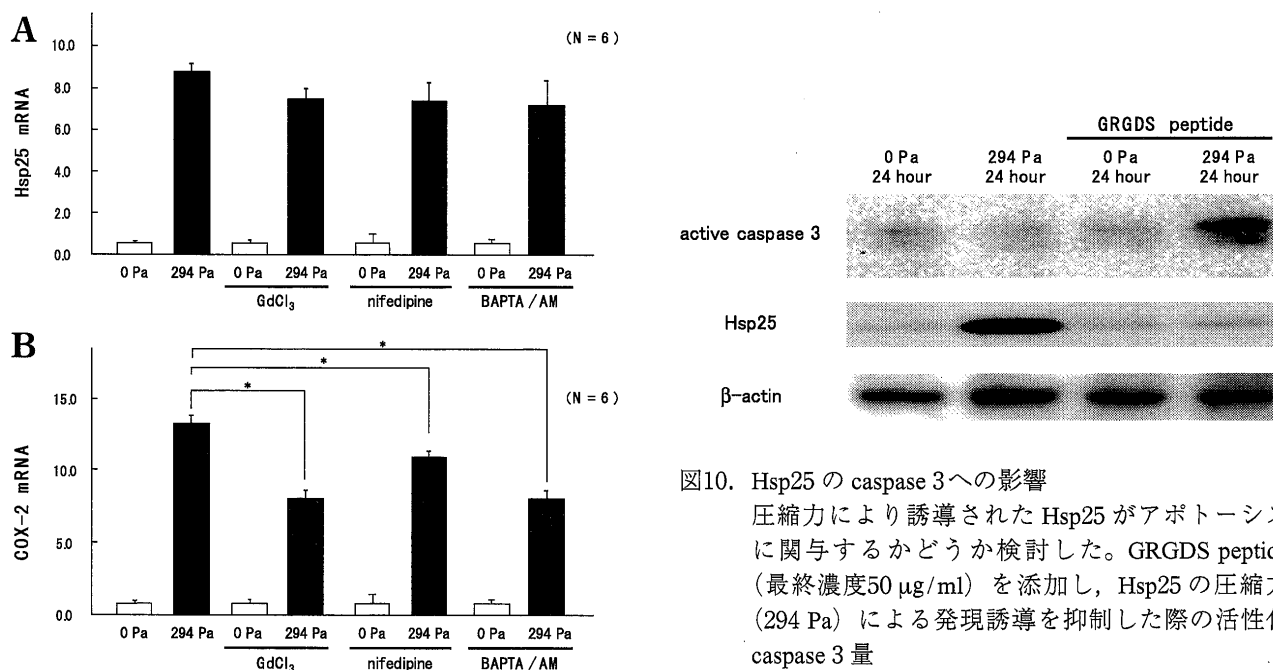


図9. 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  流入による Hsp25, COX-2 の発現誘導への関与

GdCl<sub>3</sub> (最終濃度10  $\mu\text{M}$ ), nifedipine (最終濃度10  $\mu\text{M}$ ), BAPTA/AM (最終濃度50  $\mu\text{M}$ ), を培地中に添加し, 圧縮力 (294 Pa) を加えた時の Hsp25 mRNA (A) および COX-2 mRNA (B) の増加量 (\*:  $p < 0.05$ )

図10. Hsp25 の caspase 3 への影響

圧縮力により誘導された Hsp25 がアポトーシスに関与するかどうか検討した。GRGDS peptide (最終濃度50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し, Hsp25 の圧縮力 (294 Pa) による発現誘導を抑制した際の活性化 caspase 3 量

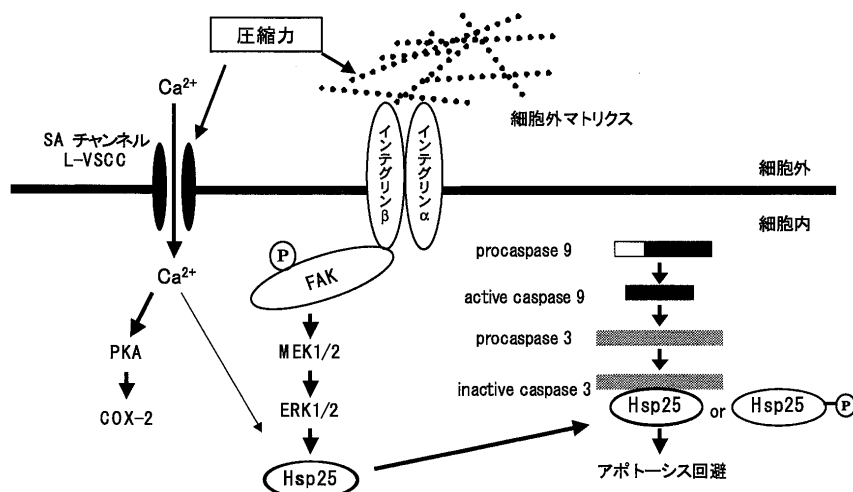


図11. MC3T3-E1 細胞の圧縮力による Hsp25 の発現誘導のメカニズム

GRGDS peptide を添加せずに圧縮力を加えた細胞では活性化 caspase 3 は認められなかったのに対し, GRGDS peptide を添加して圧縮力を加えた細胞 (Hsp25 が誘導されない細胞) では caspase 3 の活性化が認められた (図10)。

## 考 察

歯科インプラントにおけるオッセオインテグレーション

ンの喪失の原因として, プラークによる細菌感染と過剰な咬合力が挙げられる。特にインプラントは天然歯と異なり骨で咬合力を直接感受するため, 適切な咬合力の負荷はオッセオインテグレーションの獲得, 維持に重要な要素である<sup>14)</sup>。

細胞にメカニカルストレスを加えると, 種々の遺伝子発現が変化することが知られている<sup>15, 16)</sup>。歯科領域におけるメカニカルストレスの研究では歯牙の移動時に重



要な役割を果たす歯根膜細胞がよく用いられている<sup>9,17)</sup>。Yamaguchi らはヒト歯根膜細胞に引張力を加えることによって c-fos mRNA が発現するとしており<sup>9)</sup>、Kanzaki らは歯根膜細胞に圧縮力を加えることにより PGE<sub>2</sub> の合成が促進されると報告している<sup>17)</sup>。また Naruse らは骨髄間質細胞に低出力超音波パルスを加えることにより c-fos, osteocalcin, bone sialoprotein の遺伝子発現が上昇し、骨芽細胞への分化が促進されたと報告している<sup>18)</sup>。Kokubu らは骨芽細胞に超音波パルスを加えることにより COX-2 mRNA の発現が上昇すると報告している<sup>19)</sup>。COX は prostaglandin 生合成の律速酵素であり、COX-1 と COX-2 の 2 つの isozyme が存在する。COX-1 はあらゆる細胞に発現しており生体の恒常性を保つ働きがある。一方、COX-2 は炎症刺激により誘導され発現する。骨形成や骨芽細胞の分化、石灰化に COX-2 が関与していると考えられている<sup>20)</sup>。今回 MC3T3-E1 細胞に圧縮力を加えることにより、COX-2, c-fos mRNA の発現量が増加し、さらに骨芽細胞の分化マーカーである ALP mRNA の発現量が増加していたことにより、MC3T3-E1 細胞は圧縮により分化が促進されたと考えられる。また、MC3T3-E1 細胞と同じ間葉系細胞である C2C12 細胞、NIH3T3 細胞においても圧縮力により COX-2, c-fos 遺伝子が誘導されており、これらの遺伝子発現誘導は MC3T3-E1 細胞に特異的なものではなく、間葉系の細胞に一般的に生じる反応であると考えられた。しかし C2C12 細胞、および NIH3T3 細胞では圧縮力による ALP の発現は認められなかった。これは、これら 2 種の細胞が ALP を非圧縮時においては発現しておらず、圧縮時においても発現が誘導されないことより、圧縮力によっては骨芽細胞への分化が起らないことを示している。

圧縮時と非圧縮時の cDNA マクロアレイの解析結果により、BMP4 および BMP7 の発現量が増加していた。BMP は未分化の間葉系細胞を骨芽細胞へ分化させ、さらに未熟な骨芽細胞を成熟な骨芽細胞へと分化させる<sup>21,22)</sup>。このことから、圧縮力は BMP4 や BMP7 を発現させ MC3T3-E1 細胞を成熟骨芽細胞へと分化させる作用を有すると考えられた。

マイクロアレイ法の結果から、圧縮力により 48 遺伝子の発現が 2 倍以上に増加していた。さらに Real Time Quantitative RT-PCR 法とウェスタンブロッティング法によって、圧縮力により Hsp25 の発現が誘導されることが確認された。Hsp は、細胞に熱、放射線などの物理学的ストレスや、化学物質、活性酸素などの化学的ストレスが加わることにより誘導され<sup>23)</sup>、再度のストレス負荷に対する耐性の獲得や細胞機能の制御に関与すると考えられている<sup>24)</sup>。Hsp は Hsp110, Hsp90, Hsp70 などの高分子量 Hsp と、分子量 30 kDa 以下の低分子量 Hsp に大別される。高分子量 Hsp は分子シャペロンとしての機能を示すことが明らかとなっている<sup>24)</sup>。一方、低分子

量 Hsp も高分子量 Hsp と同様に細胞内において分子シャペロンとして機能することが推測されている。Hsp25 (げつ歯類では Hsp25 と呼び、ヒトでは Hsp27 と呼ぶ) は、このようなシャペロン機能の他に、アクチンフィラメントの安定性やアポトーシスの抑制に関与していると考えられている<sup>25-28)</sup>。

Kozawa らは、MC3T3-E1 細胞においては非刺激時の Hsp27 のレベルは極めて低く (3.5-7.4 ng/mg protein)<sup>29)</sup>、スフィンゴシンや prostaglandin E<sub>2</sub>, エンドセリン, シンバスタチンなどの化学物質で刺激することにより、Hsp27 のレベルが増加すると報告している<sup>29-32)</sup>。本研究においても MC3T3-E1 細胞の非圧縮時の Hsp25 mRNA, 蛋白の発現量はともに少なく、圧縮時において発現誘導が確認された。また、Hsp25 の発現誘導には MAP Kinase シグナル伝達系が関与していると考えられている。MAP Kinase シグナル伝達系には p44/42MAP Kinase (ERK1/2), p38 MAP Kinase, JNK の 3 つ経路があり、刺激する化学物質によって異なる経路が用いられている。PGE<sub>2</sub> により惹起される Hsp27 の誘導は p44/42 MAP Kinase と p38 MAP Kinase の活性化を介し<sup>30)</sup>、エンドセリン, スフィンゴシンによる Hsp27 の誘導は p38 MAP Kinase の活性化を介していることが示されている<sup>29,31)</sup>。本研究における Hsp25 の発現誘導は MEK1/2 の阻害剤 (PD98059) で mRNA, 蛋白の発現誘導が抑制され、その他の MAP Kinase の阻害剤では抑制されなかった。さらに MEK1/2 の阻害剤 (PD98059) によって p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) のリン酸化も抑制されていた。この結果より、圧縮力による Hsp25 の発現誘導は MEK から ERK へのシグナル伝達系を介することが示された。この結果は、MC3T3-E1 細胞に低出力超音波パルスを加えることにより ERK1/2 がリン酸化されるという Hatton らの報告と一致している<sup>33)</sup>。また、COX-2 の発現誘導は MAP Kinase の阻害剤では発現が抑制されなかったが、PKA の阻害剤である PKI 6-22 Amide (1 μM) により誘導が阻害された。このことから、圧縮力による COX-2 の発現誘導は PKA を介していることが示唆され、Wadhwa の MC3T3-E1 細胞に fluid flow stress を加えた研究結果<sup>34)</sup> と一致する。

血管内皮細胞などにおけるメカニカルストレスを感じ取る機構として、インテグリンが関与していることが報告されている<sup>35-38)</sup>。インテグリンは細胞表面に発現されるレセプターで α 鎖と β 鎖より構成されており、これら 2 種のサブユニットが非共有結合で会合するヘテロダイマーである。α 鎖と β 鎖で 1 : 1 の複合体を形成し、コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニン, テネイシンといった細胞外マトリクス (extracellular matrix : ECM) と結合することによって細胞外の情報を細胞内に伝達する。骨芽細胞や骨に存在する細胞外マトリクスのうち I 型コラーゲン, オステオネクチン, オステオポンチン, フィブロネクチンがインテグリンと結合する。と

くにオステオポンチンやフィブロネクチンは共通のアミノ酸配列である RGD (Arg-Gly-Asp) 配列を有しており、これが細胞表面のインテグリンに結合してインテグリンと細胞内で直接結合している分子である FAK を活性化し、さらに p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) を活性化して細胞の増殖、分化、移動などを調節していると考えられている<sup>39)</sup>。MC3T3-E1 細胞においても、インテグリンが圧縮力を感知して Hsp25 を誘導しているかどうかを検討するため、インテグリン阻害剤である GRGDS peptide を培地中に添加時の Hsp25 の発現量を検討した。GRGDS peptide 添加により、圧縮力による Hsp25 の mRNA および蛋白量が減少し、さらに p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) のリン酸化と FAK のリン酸化の増大も抑制されていた。この結果より、インテグリンが圧縮力を感知し、FAK を活性化し MEK から ERK へのシグナル伝達系を介して Hsp25 の発現を誘導していることが示された。

また骨芽細胞のメカニカルストレスの受容には、インテグリンを介するもののほかに、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  プールから  $\text{Ca}^{2+}$  の放出がおこり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇して細胞内シグナル伝達が活性化することも報告されている<sup>40)</sup>。メカニカルストレスによる細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入には主に SA チャンネルと L-VSCC の関与が想定されている<sup>6, 11)</sup>。そこで、SA チャンネルのブロッカーである  $\text{GdCl}_3$ 、L-VSCC のブロッカーである nifedipine あるいは細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートする BAPTA/AM を培地中に添加して Hsp25、および COX-2 mRNA の発現量を検討した。 $\text{GdCl}_3$ 、nifedipine あるいは BAPTA/AM 処理により圧縮力による Hsp25 の発現はやや減少傾向を示したのに対し、COX-2 の発現は BAPTA/AM、 $\text{GdCl}_3$  により約半分に減少した。これらの結果から、SA チャンネルや L-VSCC もまた圧縮力を感知し、COX-2 発現誘導に関与する機構のひとつであることが示された。

Hsp27 は procaspase 3 と複合体を形成し caspase 3 の活性化を抑制して cytochrome C 誘導性のアポトーシスを抑制するという報告がある<sup>41-43)</sup>。アポトーシスには 2 つの経路が主要な役割を果たしている。1 つは caspase による経路であり、細胞内の蛋白を分解することでアポトーシスの実行過程において重要な役割を担っている。もう 1 つの経路はミトコンドリアを介する経路で、Bcl-2 ファミリーがこの経路を制御している。本実験において、インテグリン阻害剤である GRGDS peptide を添加して Hsp25 の誘導を抑制した際の caspase 3 の活性をウェスタンブロッティング法により検討した。Hsp25 の発現誘導を抑制すると、圧縮力を加えた細胞では活性型 caspase 3 量が減少していた。このことより、圧縮力により誘導された Hsp25 は caspase 3 を不活性化することによりアポトーシスを抑制していると考えられた (図11)。

Hsp25 は MAPKAP2/3 (MAPK-activated protein kinase

2/3) によりリン酸化される<sup>44)</sup>。MAPKAP2/3 は p38 MAP Kinase や ERK, SAPK / JNK によりリン酸化、活性化が調節されることが知られている<sup>44)</sup>。MAPKAP2/3 によりリン酸化された Hsp25 は細胞骨格であるアクチンフィラメントの破壊を抑制し、I $\kappa$ B kinase と相互作用して tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) による NF- $\kappa$ B の活性を調節したり、さらに細胞質から核へと移行しアポトーシスを抑制するという報告がある<sup>27, 44-46)</sup>。本研究において、圧縮力により Hsp25 のリン酸化 (Ser 15) が促進されることを見い出しており、メカニカルストレスで誘導された Hsp25 蛋白量の増加あるいは Hsp25 のリン酸化状態のどちらが抗アポトーシスに関与しているか、今後の研究が必要である。

## 結 論

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に、ガラスシリンダーを用いて直接圧縮力を加えた際の細胞内の変化として、以下のことが明らかとなった。

1. MC3T3-E1 細胞に圧縮力を加えることにより COX-2, c-fos, ALP, BMP4, BMP7 の遺伝子発現が上昇した。
2. MC3T3-E1 細胞に圧縮力を加えることにより、Hsp25 の mRNA および蛋白の発現量が増加することが示された。
3. 圧縮力による Hsp25 の発現誘導は、インテグリンから MAP Kinase である MEK から ERK へのシグナル伝達を介することが示された。
4. インテグリンが圧縮力を感知するメカノセンサーのひとつであることが示された。
5. 発現誘導された Hsp25 は圧縮力を受けた細胞のアポトーシスを抑制していることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜りました口腔顎顔面補綴学分野、市川哲雄教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御校閲、御助言を戴きました分子薬理学分野 吉本勝彦教授、口腔顎顔面矯正学分野 森山啓司教授に深謝いたします。最後に数々の御教示と御援助を戴きました口腔顎顔面補綴学分野、分子薬理学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) Rubin J, Rubin C and Jacobs CR: Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene* 367, 1-16 (2006)
- 2) Iqbal J and Zaidi M: Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 751-755 (2005)
- 3) Miyata T, Kobayashi Y, Araki A, Motomura Y and Shin K: The influence of controlled occlusal overload on

- periimplant tissue: A histologic study in monkeys. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13, 677-683 (1998)
- 4) Cavolina JM, Evans GL, Harris SA, Minzhi Zhang, Westerlind KC and Turner RT: The effects of orbital spaceflight on bone histomorphometry and messenger ribonucleic acid levels for bone matrix proteins and skeletal signaling peptides in ovariectomized growing rats. *Endocrinology* 138, 1567-1576 (1996)
  - 5) Jagger CJ, Chow JWM and Chambers TJ: Estrogen suppresses activation but enhances formation phase of osteogenic response to mechanical stimulation in rat bone. *J Clin Invest* 98, 2351-2357 (1996)
  - 6) Inoue D, Kido S and Matsumoto T: Transcriptional induction of fosB/ $\Delta$ fosB gene by mechanical stress in osteoblasts. *J Biol Chem* 279, 49795-49803 (2004)
  - 7) Kapur S, Baylink DJ and Lau KHW: Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathway. *Bone* 32, 241-251 (2003)
  - 8) Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, Burr DB, Turner CH and Yokota H: Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three-dimensional porous matrix. *Calcif Tissue Int* 76, 261-271 (2005)
  - 9) Yamaguchi N, Chiba M and Mitani H: The induction of c-fos mRNA expression by mechanical stress in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 47, 465-471 (2002)
  - 10) Wong M, Siegrist M and Goodwin K: Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. *Bone* 33, 685-693 (2003)
  - 11) Genetos DC, Geist DJ, Liu D, Donehue HJ and Duncan RL: Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone and Miner Res* 20, 41-49 (2005)
  - 12) Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, Mayahara K, Yanagisawa M, Otsuka K and Shimizu N: Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E<sub>2</sub> production appropriately. *Life Sci* 77, 3168-3182 (2005)
  - 13) Fitzgerald J and Hughes-Fulford M: Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts. *FASEB J* 13, 553-557 (1999)
  - 14) Engel E, Gomez-Poman G and Axmann-Krcmar D: Effect of occlusal wear on bone loss and Periotest value of dental implants. *Int J Prosthodont* 14, 444-450 (2001)
  - 15) Topper JN, Cai J, Falb D and Gimbrone MA: Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: Cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10417-10422 (1996)
  - 16) Sironen RK, Karjalainen HM, Elo MA, Kaarniranta KK, Kari Torronen, Takigawa M, Helminen HJ, Lammi MJ: cDNA array reveals mechanosensitive genes in chondrocytic cells under hydrostatic pressure. *Biochem Biophys Acta* 1591, 45-54 (2002)
  - 17) Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y and Mitani H: Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand up-regulation via prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis. *J Bone Miner Res* 17, 210-220 (2002)
  - 18) Naruse K, Miyauchi A, Mitani H and Mikuni-Takagaki Y: Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res* 18, 360-369 (2003)
  - 19) Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M and Mizuno K: Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E<sub>2</sub> production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 256, 284-287 (1999)
  - 20) Forwood MR: Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J Bone Miner Res* 11, 1688-1693 (1996)
  - 21) Fiedler J, Roderer G, Gunther K and Brenner RE: BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87, 305-312 (2002)
  - 22) Yeh LCC, Tssai AD and Lee JC: Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal cell line C2C12. *J Cell Biochem* 87, 292-304 (2002)
  - 23) 小澤修, 徳田治彦: 骨代謝とストレスタンパク質27 (heat shock protein 27:HSP27). *日薬理誌* 119, 89-94 (2002)
  - 24) Mosser DD and Morimoto RI: Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23, 2907-2918 (2004)
  - 25) Takayama S, Reed JC and Homma S: Heat-shock protein as regulators of apoptosis. *Oncogene* 22, 9041-9047 (2003)
  - 26) Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA and Landry J: Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 15, 505-516 (1995)
  - 27) Guay J, Lambert H, Gingras-Breton G, Lavoie JN, Huot J and Landry J: Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock

- protein 27. *J Cell Sci* 110, 357-568 (1997)
- 28) Shakoori AR, Oberdorf AM, Owen TA, Weber LA, Hickey E, Stein JL, Lian JB and Stein GS: Expression of heat shock genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *J Cell Biochem* 48, 277-287 (1992)
  - 29) Kozawa O, Niwa M, Matsuno H, Tokuda H, Miwa M, Ito H, Kato K and Uematsu T: Sphingosine 1-phosphate induces heat shock protein 27 via p38 mitogen-activated protein kinase activation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 14, 1761-1767 (1999)
  - 30) Tokuda H and Kozawa O: Mechanism of prostaglandin E2-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Endocrinol* 172, 271-281 (2002)
  - 31) Kawamura H, Otsuka T, Matsuno H, Niwa M, Matsui N, Kato K, Uematsu T and Kozawa O: Endothelin-1 stimulates heat shock protein 27 induction in osteoblasts: involvement of p38 MAP kinase. *Am J Physiol* 277, 1046-1054 (1999)
  - 32) Wang X, Tokuda H, Hatakeyama D, Hirade K, Niwa M, Ito H, Kato K and Kozawa O: Mechanism of simvastatin on induction of heat shock protein in osteoblasts. *Ach Biochem Biophys* 415, 6-13 (2003)
  - 33) Hatton JP, Pooran M, Li CF, Luzzio C and Hughes-Fulford M: A short pulse of mechanical force induces gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an ERK 1/2 pathway. *J Bone Miner Res* 18, 58-66 (2003)
  - 34) Wadhwa S, Choudhary S, Voznesensky M, Epstein M, Raisz L and Pilbeam C: Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 46-51 (2002)
  - 35) Li S, Huang NF and Hsu S: Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem* 96, 1110-1126 (2005)
  - 36) Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S and Shyy JYJ: Mechanotransduction in response to shear stress. *J Biol Chem* 274, 18393-18400 (1999)
  - 37) MacKenna DA, Dolfi F, Vuori K and Ruoslahti E: Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest* 101, 301-310 (1998)
  - 38) Katsumi A, Orr AW, Tzima E and Schwartz MA: Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* 279, 12001-12004 (2004)
  - 39) Chen NX, Ryder KD, Pavalko FM, Turner CH, Burr DB, Qiu J and Duncan RL: Ca<sup>2+</sup> regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, 989-997 (2000)
  - 40) Weyts FAA, Li YS, Leeuwen J, Weinans H and Chien S: ERK activation and  $\alpha\beta 3$  integrin signaling through Shc recruitment in response to mechanical stimulation in human osteoblasts. *J Cell Biochem* 87, 85-92 (2002)
  - 41) Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D and Kharbanda S: Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene* 19, 1975-1981 (2000)
  - 42) Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viot S and Arrigo AP: Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol* 22, 816-834 (2002)
  - 43) Lee YJ, Lee DH, Cho CK, Chung HY, Bae S, Jhon GJ, Soh JW, Jeoung DI, Lee SJ and Lee YS: HSP25 inhibits radiation-induced apoptosis through reduction of PKC  $\delta$ -mediated ROS production. *Oncogene* 24, 3715-3725 (2005)
  - 44) Weber NC, Toma O, Wolter JI, Wirthle NM, Schlack W and Preckel B: Mechanisms of xenon- and isoflurane-induced preconditioning a potential link to the cytoskeleton via the MAPKAP-2/HSP27 pathway. *Br J Pharmacol* 146, 445-455 (2005)
  - 45) Park KJ, Gaynor RB and Kwak YT: Heat shock protein 27 association with the I $\kappa$ B kinase complex regulates tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. *J Biol Chem* 278, 35272-35278 (2003)
  - 46) Geum D, Son GH and Kim K: Phosphorylation-dependent cellular localization and thermoprotective role of heat shock protein 25 in hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem* 277, 19913-19921 (2002)